

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-265347

(43)Date of publication of application : 06.10.1998

(51)Int.Cl. A61K 7/06
A61K 35/64
A61K 35/78
A61K 35/78
A61K 35/84

(21)Application number : 09-091534

(71)Applicant : SHISEIDO CO LTD

(22)Date of filing : 26.03.1997

(72)Inventor : TAKEOKA ERIKO
HAMADA CHIKA
SUZUKI JUN
TAJIMA MASAHIRO

(54) AGENT FOR EXTENDING HAIR GROWTH PERIOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To find an ingredient having activities for extending a hair growth period and the obtain an agent for extending the hair growth period by using the ingredient as the active ingredient.

SOLUTION: This agent for extending a hair growth period is obtained by using one or not less than two components selected from the group of extracts of *Symphytum Officinale* L., *Curcuma domestica* Valton, *Zizyphus jujube* Miller Var. *inermis* Rehder, *Asarum sieboldii* Miq., *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf, *Stevia rebandiana* Bertoni, *Uncaria gambir* Roxburgh, *Gentiana lutea* L., *Humulus lupulus* L., *Azukia angularis* Ohwl, *Isodon japonicus* Hara, *Arnica montana* L., *Mentha arvensis* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Poria cocos* Wolf, *Glycine max* Merril, *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo, *Cinchona succirubra* Pavon et Klitzch, *Equisetum arvense* L., *Prunus armeniaca* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Crataegus cuneata* Siebold et Zuccarini, *Cnidium Rhizome* Makino, *Cinnamoum cassia* Blume, *Ganoderma lucidum*, *Syzygium aromaticum* Merrill et Perry and *Citrus aurantium* L. subsp. *amara* Engl. and royal jelly as an active ingredient.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.03.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 27.06.2006

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-265347

(43) 公開日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
A 6 1 K	7/06	A 6 1 K	7/06
	35/64		35/64
	35/78		35/78
			T
			D
			J
審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-91534	(71) 出願人	000001959 株式会社資生堂 東京都中央区銀座7丁目5番5号
(22) 出願日	平成9年(1997)3月26日	(72) 発明者	武岡 永里子 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 式会社資生堂第1リサーチセンター内
		(72) 発明者	浜田 千加 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 式会社資生堂第1リサーチセンター内
		(72) 発明者	鈴木 順 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株 式会社資生堂第1リサーチセンター内
		(74) 代理人	弁理士 志村 光春
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 毛髪成長期延長剤

(57) 【要約】

【課題】毛髪成長期延長効果を有する成分を見出し、これを有効成分とする毛髪成長期延長剤の提供。

【解決手段】コンフリー抽出物、ウコン抽出物、タイソウ抽出物、サイシン抽出物、ヨクイニン抽出物、ステビア抽出物、アセンヤク抽出物、ローヤルゼリー、ゲンチアナ抽出物、ホップ抽出物、アズキ抽出物、ヒキオコシ抽出物、アルニカ抽出物、ハッカ抽出物、カンゾウ抽出物、ブクリョウ抽出物、ダイズ抽出物、シソ抽出物、キナ抽出物、スギナ抽出物、アンズ核粒抽出物、カンゾウ抽出物、サンザシ抽出物、センキュウ抽出物、ケイヒ抽出物、レイシ抽出物、チョウジ抽出物及びトウヒ抽出物からなる群の成分から選ばれる1種又は2種以上の成分を有効成分とする毛髪成長期延長剤を提供すること。

【特許請求の範囲】

【請求項1】コンフリー抽出物、ウコン抽出物、タイソウ抽出物、サイシン抽出物、ヨクイニン抽出物、ステビア抽出物、アセンヤク抽出物、ローヤルゼリー、ゲンチアナ抽出物、ホップ抽出物、アズキ抽出物、ヒキオコシ抽出物、アルニカ抽出物、ハッカ抽出物、カンゾウ抽出物、ブクリョウ抽出物、ダイズ抽出物、シソ抽出物、キナ抽出物、スギナ抽出物、アンズ核粒抽出物、カンゾウ抽出物、サンザシ抽出物、センキュウ抽出物、ケイヒ抽出物、レイシ抽出物、チョウジ抽出物及びトウヒ抽出物からなる群の成分から選ばれる1種又は2種以上の成分を有効成分とする毛髮成長期延長剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、毛髮成長期延長剤に関する技術分野に属する発明である。より詳細には、毛髮伸長の促進をすることによって毛周期における成長期を維持又は延長する毛髮成長期延長剤に関する。

【0002】

【従来の技術】高齢化社会、ストレス社会といわれる現代社会では、頭部毛髮が様々な原因により脱毛の危機にさらされる機会がますます多くなってきている。これに対応して、より優れた「育毛料」を提供すべく様々な試みがなされている。育毛料が毛髮に与える効果として主なものに、①発毛誘導効果（発毛促進効果、成長期誘導効果）、②毛髮を太くする効果、③毛髮成長期延長効果、④5 α -レダクターゼ阻害効果、⑤血行促進効果、⑥殺菌効果、⑦フケ防止効果、⑧保湿効果、⑨抗酸化効果等の効果が挙げられる。

【0003】しかしながら、前記のように種々の試みがなされているにもかかわらず、従来の育毛料では、その脱毛防止、発毛効果等の育毛作用は必ずしも十分なものではなかった。これはおそらく脱毛の原因がさまざまであり、また発毛の機構も非常に複雑であるためと考えられている。今まで提供されている「育毛料」は、脱毛を比較的大雑把な概念、言い換えれば漫然と「脱毛」という現象のみを捉えて開発されており、そのメカニズムにまで突っ込んで着目して開発されたものは決して多くない。その大きな理由が、これらのメカニズムに着目した育毛効果を簡便に検定することが可能な育毛薬剤検定方法が十分に提供されていなかったという面を否定できないことである。特に上記③の毛髮成長期延長効果を検定する育毛薬剤検定方法の確立は難しく、結果としてこれまで提供されてきた育毛料は、毛周期の成長期へと毛髮を誘導して育毛する上記①発毛誘導効果に着目したものが多かった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者は *in vitro* で行う簡便な上記③の毛髮成長期延長効果を検定する育毛薬剤検定方法を確立し、その育毛薬剤検定方法

を用いて上記③の毛髮成長期延長効果を有する成分を有効成分とする毛髮成長期延長剤を見出すことを目指した。

【0005】本願は、その一連の課題のうち、特に上記③の毛髮成長期延長効果を有する成分を見出し、これを有効成分とする毛髮成長期延長剤を提供することをその課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、種々の物質における上記③の毛髮成長期延長効果を有する成分について、本発明者が見出した育毛薬剤検定方法を用いて鋭意検討したところ、特定の植物の抽出物等に、所望する毛髮成長期延長効果が認められることを見出し、本発明を完成した。

【0007】すなわち本発明は、コンフリー抽出物、ウコン抽出物、タイソウ抽出物、サイシン抽出物、ヨクイニン抽出物、ステビア抽出物、アセンヤク抽出物、ローヤルゼリー、ゲンチアナ抽出物、ホップ抽出物、アズキ抽出物、ヒキオコシ抽出物、アルニカ抽出物、ハッカ抽出物、ブクリョウ抽出物、ダイズ抽出物、シソ抽出物、キナ抽出物、スギナ抽出物、アンズ核粒抽出物、カンゾウ抽出物、サンザシ抽出物、センキュウ抽出物、ケイヒ抽出物、レイシ抽出物、チョウジ抽出物及びトウヒ抽出物からなる群の成分から選ばれる1種又は2種以上の成分を有効成分とする毛髮成長期延長剤を提供する発明である。

【0008】前記したように、本発明において「毛髮成長期延長剤」は、主に後述する育毛薬剤検定方法によって少なくとも毛包上皮系細胞の分裂増殖活性を維持又は促進することで毛髮の成長期を延長する効果を有する成分を有効成分として配合した、特に上記③の毛髮成長期延長効果に着目した毛髮関連薬剤であり、いわば「個別効能育毛料」としての特徴を有する。

【0009】この「毛髮成長期延長剤」は、例えば毛根近傍における毛包上皮系細胞の増殖が緩徐であること等により成長期が短くなって、相対的に成長期よりも休止期毛の割合が多くなってしまいうことに起因する脱毛症に特に有効な薬剤である。また、他の個別効能を有する育毛料と組み合わせて用いることにより、幅広い脱毛症においては、総合的かつ相乗的な効果を上げることが可能である。すなわち、この「毛髮成長期延長剤」は、前記した①～⑨の効果を包含する概念を有する一般的な育毛料用途とは一線を画する用途を有するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。本発明毛髮成長期延長剤は、上に列挙した植物抽出物等をその有効成分とする毛髮関連薬剤である。

【0011】コンフリーは、別名ヒレハリソウ (*Symphytum Officinale* L.) ともいい、ヨーロッパ原産の多年生

の草木である。その葉から抽出されるコンフリー抽出物は、収斂作用や消炎作用を有することが知られており、一般化粧品の配合成分として市販もされている。

【0012】本発明において用いられるコンフリーは、その抽出物が後述する毛周期における成長期を延長する作用を有する限りにおいて、その変種、亜種等の他の種に属するものであってもよい（本発明においては、これらをコンフリーと総称する）。

【0013】ウコン(*Curcuma domestica* Valtan)は、熱帯アジア原産の多年生草木である。その根から抽出されるウコン抽出物は、黄色を呈しており、その色素の主成分はクルクミンとして知られている。このウコン抽出液は、利胆薬、食品添加物等として知られており、市販もされている。

【0014】本発明において用いられるウコンは、その抽出物が後述する毛周期における成長期を延長する作用を有する限りにおいて、その変種、亜種等の他の種に属するものであってもよい（本発明においては、これらをウコンと総称する）。

【0015】タイソウは、ナツメ(*Zizyphus jujube* Miller Var. *inermis* Rehder) 又はその近縁植物の果実のことを意味するものであり、その抽出物は保湿作用や消炎作用が認められており、一般化粧品の配合成分として市販もされている。

【0016】サイシンは、本州、九州、朝鮮半島及び中国に分布する山林の樹陰に生える多年草であるケイリンサイシン(*Asarum sieboldii* Miq.)の根部及び根茎部のことをいう。

【0017】本発明において用いられるサイシンは、ケイリンサイシンは勿論のこと、その抽出物が後述する毛周期における成長期を延長する作用を有する限りにおいて、その変種、亜種等の他の種に属するもの、例えばウスバサイシン(*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitagawa) 等であってもよい（本発明においては、これらをサイシンと総称する）。

【0018】サイシンの抽出物は、少なくともメチルオイゲノール、アサリルケトン、 α -ビネン、 β -ビネン、オイカルボン、サフロール、シネオール等の精油成分やベリトリン、ヒゲナミン等の辛味成分等を一体として含むことが確認されており、現在市販もされている。

【0019】ヨクイニンは、ハトムギ(*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf)の果実からほうしょうと果皮、種皮を除いたもののことをいい、灰白色の卵形～広卵形で一方に深い溝が認められ、消炎、利尿効果等の多種の薬効を有する漢方薬として知られており、現在市販もされている。ヨクイニンの抽出物は、少なくともcoixenolideを含有し、その他粗タンパク質、粗脂肪、デンプン、灰分等を一体として含むことが知られている。

【0020】ステビア抽出物は、ステビア(*Stevia reba*

ndiana Bertoni)の地上部を水で抽出して乾燥したものであり、ステビオサイドをはじめ、数種の甘味成分を含むことが知られており、市販もされている。

【0021】アセンヤク抽出物は、アセンヤク(*Uncaria gambir* Roxburgh)の葉及び若枝を抽出して採取されるもので、保湿作用、収斂作用、止血作用を有する植物抽出成分として市販もされている。

【0022】ゲンチアナ抽出物は、ゲンチアナ(リンドウ、*Gentiana lutea* L.)の根及び根茎から得られる抽出液で、保湿作用、抗炎症作用等を有する植物抽出成分として市販もされている。

【0023】ホップ抽出物は、クワ科植物であるホップ(*Humulus lupulus* L.)の雌花穂(球果)から抽出して得られる植物抽出物で、保湿作用、収斂作用、殺菌作用等を有する植物抽出成分として市販もされている。

【0024】ヒキオコシは、ヤマハッカ属に属するヒキオコシ(*Isodon japonicus* Hara)のことをいい、その茎葉部は延命草として、消化器系に効能のある漢方薬として知られている。

【0025】本発明において用いられるヒキオコシは、ヒキオコシは勿論のこと、その抽出物が後述する毛周期における成長期を延長する作用を有する限りにおいて、その変種、亜種等の他の種に属するもの、例えばカメバヒキオコシ〔(*Isodon kameba* Okuyama):全草が抽出の対象となる〕やクロバナヒキオコシ〔(*Isodon trichocarpus* Kudo):茎葉部が抽出の対象となる〕等であってもよい（本発明においては、これらをヒキオコシと総称する）。ヒキオコシの抽出物には、少なくとも苦味質のエンメインやノドシン等を一体として含むことが知られており、現在市販もされている。

【0026】本発明において用いられるアズキ抽出物、もっぱら食用とされているアズキ(*Azuki angularis* Ohwi)の種子の抽出物であり、漢方では利尿、消炎等の用途にも用いられることがある。アズキ抽出物には、少なくともバルミチン酸、ステアリン酸、アラキシン酸及び3種の結晶性サポニン等を一体として含むことが知られており、アズキ末として市販もされている。

【0027】アルニカ抽出物は、アルニカ(*Arnica montana* L.)の花の抽出物であり、消炎鎮痛作用、血流促進作用、保湿作用等を有する植物抽出成分として知られており、市販もされている。

【0028】カンゾウ抽出物は、カンゾウ(*Glycyrrhiza glabra* L.)及びその他の同属植物の根及び根茎から抽出して得られる抽出物であり、消炎作用等を有する植物成分として知られており、市販もされている。

【0029】ハッカ抽出物は、ハッカ(*Mentha arvensis* L. 等)を、水蒸気蒸留等することにより得られる精油であり、総メントール50.0%以上を含み、市販もされている。

【0030】センキュウ抽出物は、センキュウ(*Cnidium*

Rhizome Makino)の根茎の抽出物であり、各種の薬効を有する植物抽出成分として知られており、市販もされている。

【0031】ブクリョウ抽出物は、マツホド(Poria cocos Wolf)の通例であり、外層をほとんどのぞいた菌核から抽出して得られる抽出物であり、消炎作用、皮膚賦活作用を有する成分として知られており、市販もされている。

【0032】ダイズ抽出物は、ダイズ(Glycine max Merrill)の種子を、煮沸、粉碎したものから抽出される植物抽出物であり、市販もされている。

【0033】シソ抽出物は、シソ(Perilla frutescens Britton var. acuta Kudo)又はその近縁植物の葉及び枝先から抽出され、美白作用や抗炎症作用を有することが知られている植物抽出物であり、市販もされている。

【0034】キナ抽出物は、キナ(Cinchona succinubra Pavon et Klotzsch)又はその近縁植物の樹皮から抽出され、皮膚刺激作用、収斂作用等を有する植物抽出成分として知られており、市販もされている。

【0035】スギナ抽出物は、スギナ(Equisetum arvense L.)の全草から抽出され、保湿作用、消炎作用、収斂作用等を有することが知られている植物抽出成分であり、市販もされている。

【0036】アンズ核粒抽出物は、ホンアンズ(Prunus armeniaca L.)又はその近縁植物の核(内果皮)の乾燥粉砕物から抽出される植物抽出物であり、市販もされている。

【0037】サンザシ抽出物は、サンザシ(Crataegus cuneata Siebold et Zuccarini)の果実から抽出され、保湿作用、収斂作用等を有することが知られている植物抽出成分であり、市販もされている。

【0038】ケイヒ抽出物は、Cinnamomum cassia Blume又はその近縁植物の樹皮から抽出され、チロシナーゼ活性阻害作用を有することが知られている植物抽出成分であり、市販もされている。

【0039】レイシ抽出物は、マンネンタケ子実体から抽出され、保湿作用、皮膚再生作用等を有することが知られている抽出物であり、市販もされている。

【0040】チョウジ抽出物は、チョウジ(Syzygium aromaticum Merrill et Perry)のつばみを乾燥させたものから抽出され、抗菌作用、血流促進作用等を有することが知られている植物抽出成分であり、市販もされている。

【0041】トウヒ抽出物は、ダイダイ(Citrus aurantium L. subsp. amara Engl.)の成熟した果皮から蒸留して得られる精油であり、市販もされている。

【0042】これらの植物等の抽出物を抽出する際には、植物由来の抽出物を抽出する際に一般的に用いられる方法で行うことができる。すなわち、前記した植物を、生のまま、又は必要により乾燥した後、そのまま若

しくは粉砕して溶媒抽出に供することにより得ることができる。この際用い得る溶媒は、植物からその植物の成分を抽出する際に用いられる一般的な溶媒を用いることが可能であり特に限定されず、例えば熱水；メタノール、エタノール、イソプロパノール、n-ブタノール等の低級アルコール；プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール等の多価アルコール；これらのアルコール類の含水物；n-ヘキサン、トルエン等の炭化水素系溶媒等を挙げることができるが、メタノールやエタノール等の低級アルコールを抽出溶媒として用いるのが好ましい。これらの低級アルコールを抽出溶媒として用いる場合、得られる抽出液をそのまま本発明毛髪成長期延長剤の有効成分として配合することができるが、抽出溶媒を一旦留去し、必要により乾燥後に配合することも可能である。このようにして、上記の植物の抽出物を得ることができる。

【0043】また、本発明において用いられるローヤルゼリーは、ミツバチの働きバチが女王蜂に与える餌で、王乳とも呼ばれ、働きバチの頭部に発達する下咽頭腺等から分泌され、市販もされている。このローヤルゼリーには、少なくとも主成分としてのタンパク質、10-ヒドロキシデセン酸等の遊離脂肪酸、ビタミン類等を一体として含むことが知られている。

【0044】上記した諸成分は、前述の工程に従って製造したり、自然界に存在するものを採取することで入手することが可能であるが、上記した市販品を本発明本発明毛髪成長期延長剤の有効成分として用いることができる。

【0045】本発明毛髪成長期延長剤の有効成分として配合される上記成分の、後述する毛包上皮系細胞の増殖作用はこれらのいずれの成分に由来するのかは定かではないが、上述のように全体として強い毛包上皮系細胞の増殖作用を有している。

【0046】本発明毛髪成長期延長剤における上記成分の配合量は、本発明毛髪成長期延長剤の具体的形態等に依りて適宜選択し得るものであり、特に限定されるべきものではないが、概ね本剤全体に対して抽出物の乾燥物として0.00005重量%以上、20.0重量%以下、好ましくは同0.01重量%以上、10.0重量%以下となるように配合される。

【0047】本剤全体に対して抽出物の乾燥物として0.00005重量%未満の配合量では、本発明の所期の効果である毛包系細胞増殖作用に基づく毛髪成長期延長効果が十分に発揮されず好ましくなく、同20.0重量%を超えて配合しても、配合量の増加に見合った効果の増大を見込めないばかりではなく、製剤上支障をきたす傾向が顕著となり好ましくない。

【0048】また、上記成分は、それぞれ1種の成分を本発明毛髪成長期延長剤の有効成分として配合することも可能であるが、適宜2種以上を組み合わせる

ことも可能である。

【0049】このようにして、上記成分を有効成分として配合した本発明毛髪成長期延長剤は、優れた毛包系細胞増殖作用に基づく毛髪成長期延長効果を有し、前記したように、例えば毛根近傍における毛包上皮系細胞の増殖が緩徐であること等により成長期が短くなって、相対的に成長期毛よりも休止期毛の割合が多くなってしまふことに起因する脱毛症に特に有効な薬剤である。また、他の個別効能を有する育毛料と組み合わせて用いることにより、特定の脱毛症においては相乗的な効果を上げることもまた可能である。

【0050】本発明毛髪成長期延長剤の所期の効果である毛髪成長期延長効果における本質的作用である、毛周期における成長期の維持又は延長作用を特定する手段は、その特定法自体がその作用を特定するために妥当なものである限り特に限定されず、例えば *in vitro* における特定法も、*in vivo* における特定法も用いることができるが、その簡便性と有効性を考慮すると、*in vitro* における特定法を用いることが好ましい。以下、この *in vitro* における特定法の一つである、毛包系上皮培養細胞の増殖効果を検討することを特徴とする特定法について簡単に説明する（より具体的には、実施例において記載する。）。

【0051】すなわちこの特定法は、「毛包上皮系培養細胞に無血清培地中で対象物質を接触させて、その細胞の増殖活性の有無及び／又は強弱を特定することにより、その対象物質の毛周期における成長期を延長する効果を検定する育毛薬剤検定方法」、すなわち毛髪の伸長に直接的に関係する毛包上皮系細胞に着目し、この培養細胞を用いることによって、所望する毛周期における成長期を延長する効果を特定する、*in vitro* の育毛薬剤検定方法である。

【0052】この育毛薬剤検定方法においては、動物（ヒトを含む、以下同様である）の毛包上皮系細胞を単離して得た培養細胞である「毛包上皮系培養細胞」に対象物質を接触させて、その増殖の有無及び／又は強弱を特定する。毛包上皮系細胞は、特に毛根近傍の外毛根鞘細胞とマトリクス細胞等の細胞のことを指し、内側の毛乳頭細胞は除外される。

【0053】毛周期における成長期は、まさにこの毛髪の伸長、すなわち毛包上皮系細胞が分裂して増殖している時期であり、同退行期及び休止期はこれが鈍化して休止する時期である。つまり、毛周期における成長期を延長させる物質は、その投与により毛包上皮系細胞の分裂及び増殖活性を維持することによって、毛髪が毛周期における退行期及び休止期への移行を防ぐ物質、すなわち毛包上皮系細胞の増殖を促進又は維持し続ける物質であることが結論付けられる。

【0054】なお *in vitro* の育毛薬剤検定方法としては、他に対象物質を動物の毛乳頭細胞に作用させて、そ

の増殖促進効果を判定する方法も用いることができる。

【0055】また、*in vivo* における特定法としては、例えば「ヌードマウスに対象物質を投与し、このヌードマウスの体表の発毛部位の状態を特定して、対象物質の毛周期における成長期を延長する効果を検定する育毛薬剤検定方法」、すなわち原則的には無毛であるが、その体表に経時的にその発毛部位が移動する特徴的な発毛をするヌードマウスにおける発毛部位の広さと発毛部位の移動速度を特定することによって、毛周期における成長期の長さを検定する方法等を挙げることができる。

【0056】本発明毛髪成長期延長剤が採り得る剤型は、外皮に適用可能な剤型であれば特に限定されず、例えば液状、乳液、軟膏等を選択可能である。また、本発明毛髪成長期延長剤の形態は任意であり、例えばトニック、ヘアークリーム、ムース、シャンプー、リンス、クリーム、乳液、化粧水、パック等の形態を採ることができる。

【0057】本発明毛髪成長期延長剤前記の必須成分に加えて必要に応じて、かつ本発明の所期の効果を損なわない限りにおいて、化粧品、医薬部外品、医薬品等において一般的に用いられる各種油性若しくは水性成分、保湿剤、増粘剤、防腐剤、酸化防止剤、香料、色剤、各種薬剤等を配合することができる。

【0058】例えば、高級脂肪酸、固形パラフィン、流動パラフィン、シリコーン油、スクワラン、モノオレイン酸グリセリル、オリーブ油、イソプロピルミリステート、高級脂肪酸、高級アルコール等の油分；グリセリン、ヒアルロン酸、プロピレングリコール、マルチトール、アテロコラーゲン、乳酸ナトリウム等の保湿剤；マルメロ粘質物、カルボキシビニルポリマー、キサンタンガム等の増粘剤；ニコチン酸アミド、ニコチン酸ベンジル、ビタミンEアセテート、センブリ抽出物、塩化カルプロニウム、アセチルコリン誘導体等の血管拡張剤；セリン、メチオニン、アルギニン等のアミノ酸類；ビタミンB₆、ビタミンE（若しくはその誘導体）、ビオチン、パントテン酸（若しくはその誘導体）等のビタミン類；ニコチン酸、ニコチン酸メチル、ニコチン酸トコフェロール等のニコチン酸エステル類；セファランチン等の皮膚機能亢進剤；エストラジオール等の女性ホルモン剤；グリチルレチン酸（若しくはその誘導体）等の消炎剤；ヒノキチオール、ヘキサクロロフェン、ベンザルコニウムクロリド、ピチオノール等の抗菌剤；メントール等の清涼剤；サリチル酸、亜鉛（若しくはその誘導体）、乳酸（若しくはそのアルキルエステル）等；クエン酸等の有機酸類等を配合することができる。本発明毛髪成長期延長剤の具体的処方後述する。

【0059】

【実施例】以下、実施例等により本発明をさらに具体的に説明するが、この実施例等により本発明の技術的範囲が限定的に解釈されるべきものではない。なお、以下の

実施例等において「%」と表示され、かつ内容量を示すものは、特に断らない限り重量%を意味する。まず、本実施例等において用いた植物の抽出物の毛髪成長期延長作用を評価するための *in vitro* の細胞増殖試験について説明する。

【0060】〔試験例1〕 毛包上皮系培養細胞を用いた細胞増殖試験

A. ヒト毛包上皮系細胞

1. ヒト毛包上皮系細胞の採取

外科手術の副産物として得られたヒト男性頭皮から毛周期における成長期の毛包を实体顕微鏡下で機械的に採取した。この成長期の毛包を1000 U/ml dispase・0.2% コラゲナーゼを含むダルベッコの改変MEM (DME M) で30分間、37℃で処理し、注射針の先を用いて dermal sheath や dermal papilla、毛球部上皮組織を除去して、0.05%トリプシン・0.02% EDTA を含むリン酸緩衝液 [PBS (-) : (-) とはカルシウムイオンやマグネシウムイオンを含まない意味である] で5分間、37℃で処理した。

【0061】次にコラーゲン (Type I) コーティングした培養皿に毛包を静置し、外殖片培養を行った。なおこの際の培地は、無血清培地 [Keratinocyte Growth Medium (KGM)] を用いた (Keratinocyte Serum Free Medium を用いることもできる)。この培養の4~5日後に、毛包の培養皿への接着及び細胞の増殖が確認できた時点で培地を交換し、これ以降2日おきに培地交換を行った。このようにして増殖させた細胞を、0.05wt%トリプシン・0.02% EDTA で37℃で5分間処理した後、等量の0.1%トリプシンインヒビターで反応を停止させ、遠心処理 (800×g, 5分間) を施して細胞を回収した。

【0062】次に、細胞を上記の無血清培地に浮遊させて、5000 cells/cm² の密度でコラーゲンコーティング (Type I) した培養皿に播種し、細胞が subconfluent になるまで2日おきに培地交換を行い、再び0.05wt%トリプシン・0.02% EDTA で37℃で5分間処理した後、等量の0.1%トリプシンインヒビターで反応を停止させ、遠心処理 (800×g, 5分間) を施して、これにより得られたヒト毛包上皮系細胞に細胞凍結液 (セルバンカー: ダイアトロン製) を添加し、1.0×10⁶ cell/ml の濃度に調整して、各凍結チューブに1.0×10⁶ cellずつ入れ、これを凍結保存した。なお、これらの細胞数は、血球算定板で算出した。

【0063】2. 対象物質のアッセイ

上記工程により得た毛包上皮系細胞の線維芽細胞混入率 (FB混入率) を測定 (3000倍、5視野) し、その結果FB混入率が3%以上のものは、アッセイの対象から除外した。そして、この毛包上皮系細胞を培養フラスコ中に播種後、これを0.05%トリプシンと0.02% EDTA で処理した後、0.1%トリプシンインヒビ

ターで反応を停止後、系を1500 rpm で5分間遠心処理を施し、上清を除去し、残渣にKGM培地20mlを添加して、細胞懸濁液を調製した。

【0064】0.2 ml/well の割合で、96 well-plate (I型コラーゲンコーティングプレート: ファルコン社製) に播種し (1.0×10⁴ cell/well)、細胞がウエルの底に沈むまで約20分間室温下で放置した。その後、37℃、5%CO₂ で1日間培養を行い、所望するヒト毛包上皮系培養細胞を得た。

【0065】B. ラット毛包上皮系細胞

1. ラット毛包上皮系細胞の採取:

(1) 毛包の採取

新生児 (3~4日令) のラットをエタノールで消毒後、二酸化炭素で屠殺し、これらのラットの背部皮膚をハサミで採取した。次いで、この採取した背部皮膚を1% P S F 含有PBS (-) に2枚ずつ浸した。その後、皮膚脂肪層から下の皮下脂肪や皮膜等を解剖用ハサミで除去した。次いで、再びこの背部皮膚を1% P S F 含有PBS (-) に浸し、さらにこれを0.25%トリプシン含有PBS (-) (0.02% EDTA 含む。以下、同様である。) 中に4℃で一晩浸した。

【0066】このトリプシン溶液中における浸漬後、背部皮膚の真皮層と表皮層をピンセットで剥がした後、真皮層を0.35%のコラゲナーゼを含有させたHam's F12培地 [組成 (mg/L): 1-Alanine (8.9), 1-Arginine (HCl:211), 1-Asparagine (13.2), 1-Aspartic acid (13.3), 1-Cysteine (HCl:31.5), 1-Glutamic acid (14.7), 1-Glutamine (146), Glycine (7.5), 1-Histidine (HCl:19), 1-Isoleucine (3.9), 1-Leucine (13.1), 1-Lysine (HCl:36.5), 1-Methionine (4.5), 1-Phenylalanine (5.0), Proline (34.5), 1-Serine (10.5), 1-Threonine (11.9), 1-Tryptophan (2.0), 1-Tyrosine (5.4), 1-Valine (11.7), Biotin (0.0073), Choline (Cl:14.0), Vitamin B12 (1.36), 葉酸 (1.32), Inositol (18.0), Nicotinamide (0.037), パントテン酸 (Ca: 0.477), Vitamin B6 (HCl:0.062), Vitamin B2 (0.038), Vitamin B1 (HCl:0.337), CaCl₂ (2H₂O:44.0), CuSO₄ · 5H₂O (0.0025), FeSO₄ · 7H₂O (0.834), KCl (224.0), MgCl₂ (6H₂O:122), "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288 (1965)"] 以下同様である] が入った100 mm dish 移し、ハサミで裁断した。この裁断物を含む培地を37℃で35分間浸透を行った (60 rpm)。浸透後、このコラゲナーゼ反応物中に塊状のものが見えなくなるまでビベッティングを行い、これを50 ml遠沈管に移し、DNase (10000 unit) を含有させたHam's F12培地を添加し、5分間放置した。

【0067】放置後、得られた懸濁液をさらにビベッティングした後、ナイロンメッシュ (Nytex 157 mesh) で濾過し、これを50 ml遠沈管に移した。懸濁液を半量ずつに分け、それぞれについてPBS (-) を容量が30 mlになるまで懸濁液を希釈し、次いでこの希釈した懸濁

液に遠心処理を施した(4℃, 400 rpm, 5分間)。遠心後、上清を除いて脂肪分を系から除去した。次いで、残渣にPBS(-)を25ml添加して懸濁後、これにさらに遠心処理を施した[(4℃, 400 rpm, 5分間)×3回]。この遠心操作により得られた残渣が、ラットの背部皮膚における毛包である。

【0068】(2) 毛包上皮系細胞の採取

上記操作により得られた毛包に、0.25%トリブシン含有PBS(-)を5ml添加して、細胞懸濁液を37℃で5分間インキュベートした。インキュベート終了後、500 μm Nalgene 社製の等量の牛胎児血清(FBS)とHam's F12培地を添加して、細胞懸濁液をセルストレーナー(100 μm Nalgene 社製)で濾過後、50ml遠沈管に入れて、この細胞懸濁液に遠心処理を施した(4℃, 1500 rpm, 5分間)。この系から上清を除去して、残渣として所望する毛包上皮系細胞を得た。この毛包上皮系細胞に細胞凍結液(セルバンカー:ダイアトロン製)を添加し、 1.5×10^7 cell/mlの濃度に調整して、各凍結チューブに 1.5×10^7 cellずつ入れ、これを凍結保存した。なお、これらの細胞数は、血球算定板で算出した。

【0069】2. 毛包上皮系細胞の前培養: 系に混入している線維芽細胞を可能な限り系から除去するために、上記工程により得られた毛包上皮系細胞の前培養を行った。以下、その手順について説明する。37℃の恒温槽で、上記工程により得た凍結細胞を融解した。次いでFAD培地(Ham's F12培地(後述)とMEN培地を容量比で3対1で混合したものに、インシュリン(5.0 μg/ml)、ハイドロコルチゾン(0.45 μg/ml)、エビダーマルグロウスファクター(EGF)(10.0 ng/ml)、コレラトキシシン(10^{-9} M)及びウシ胎児血清(10%)を含有させた培地、以下同様である)を10ml添加し、細胞溶液を希釈して系に遠心処理を施した(10℃以下, 1500 rpm, 5分間)。遠心後、上清を除去し、系にFAD培地を10ml添加して、細胞塊が認められなくなるまでビベッティングを繰り返した。

【0070】得られた細胞数を血球算定板で算出し、FAD培地で 2.5×10^4 cell/mlの濃度になるように調整した。I型コラーゲンでコーティングした75 cm²のフラスコに細胞を播種して、これを37℃, 5%CO₂で一晩培養した。培養後、系をPBS(-)10mlで2回洗浄し、0.25%トリブシン含有PBS(-)を2ml添加して、これを37℃, 5%CO₂で4分間インキュベートした。次に、系に牛胎児血清(FBS)を2ml添加して、1回軽くゆすった後で上清を除去して、系に混入している線維芽細胞を除去した。

【0071】さらに、系にKGM培地(表皮角化細胞基礎培地(Keratinocyte growth medium): Keratinocyte basal medium (KBM培地(改変MCDB153培地(クローネティックス社製)))に、ウシ脳下垂体エキ

ス(BPE)(0.4 vol%), インシュリン(0.5 μg/ml), ハイドロコルチゾン(0.5 μg/ml), h-EGF(0.1 ng/ml)を添加した培地、以下同様である)を15ml添加し、37℃, 5%CO₂で3日間培養した。

【0072】3. 対象物質のアッセイ

上記工程により得た毛包上皮系細胞を播種した培養フラスコの線維芽細胞混入率(FB混入率)を測定(3000倍, 5視野)し、その結果FB混入率が3%以上のものは、アッセイの対象から除外した。系をPBS(-)10mlで2回洗浄し、0.25%トリブシン含有PBS(-)を2ml添加して、これを37℃で3分間インキュベートした。次いで上皮系細胞と線維芽細胞とのトリブシンに対する反応性の違いを利用して、系から線維芽細胞を除去するために、トリブシンを除去し、再び0.25%トリブシン含有PBS(-)を2ml添加して、37℃, 20 rpmで5分間振盪した。

【0073】次いで、細胞のはがれを顕微鏡下で確認した後、10%FBS含有DMEM培地を10ml添加して、50ml遠心チューブ中でビベッティングを行い、系を1500 rpmで5分間遠心処理を施した。上清を除去し、KGM培地20mlを添加して、細胞塊がなくなるまでビベッティングを行った。

【0074】懸濁液をセルストレーナー(100 μm Nalgene 社製)で濾過後、50ml遠沈管に入れて、懸濁液中の生細胞数を血球算定板で算出し、系にKGM培地を添加して、系の中の細胞濃度が 5.0×10^4 cell/mlになるように調整した。次いで、0.2 ml/wellの割合で、96 well-plate(I型コラーゲンコーティングプレート: フアルコン社製)に播種し(1.0×10^4 cell/well)、細胞がウエルの底に沈むまで約20分間室温下で放置した。その後、37℃, 5%CO₂で1日間培養を行い、所望するヒト毛包上皮系培養細胞を得た。

【0075】C. 試験培地の調製:

(1) 抽出物の調製

市販のコンフリー(乾燥物)500gを、7.5 lの30%エタノールに室温(23℃)で5日間浸漬した。抽出液から溶媒を留去し、コンフリーの30%エタノール抽出乾燥物50gを得た。その他の植物抽出物についても、市販の該当する植物(原則として乾燥物)を入手して、下記第1表に示す抽出方法で抽出して、それぞれの乾燥抽出物を調製した。なお、ローヤルゼリーは市販のローヤルゼリー粉末を用いた。

【0076】(2) 対象物質添加培地の調製

対象物質を約1.5 mgスクリュウ管に秤量し、有機溶剤(DMSO)で0.2%溶液になるように調製した。次いで、上記の生薬抽出物のDMSO溶液を1000倍量の前記KBM培地に添加した[抽出物濃度: 2.0×10^{-4} % (DMSO 0.1%)]。

【0077】なお、対象物質として用いた生薬抽出物等は、コンフリー抽出物、アルニカ抽出物、ハッカ末、ダ

10

20

30

40

50

イズ抽出物、キナ抽出物、スギナ抽出物、チョウジ抽出物、ホップ抽出物、シソ抽出物、アセンヤク抽出物、アズキ末、サイシン抽出物、チンビ抽出物、ケイヒ抽出物、ブクリョウ抽出物、アロエ抽出物、レイシ抽出物、ゲンチアナ抽出物、カンゾウ抽出物、ショウブ根、ウコン抽出物、トウヒ抽出物、ステビア抽出物、サンザシ抽出物（カンゾウフラボノイドを含む）、センキュウ抽出物、タイソウ抽出物、サフラン抽出物、ヒキオコシ抽出物、ヨクイニン抽出物、アンズ核粒抽出物及びローヤルゼリーであった。

【0078】また同様に対照として、チャ抽出物（抽出法：水抽出）、バクモンドウ抽出物（抽出法：10%エタノール抽出）の0.2%DMSO溶液を調製した。これらの対象物質添加培地0.2mlを、0.1%DMSO含有KBM培地1.8mlに添加し、対象物質の濃度を $2.0 \times 10^{-3}\%$ になるように調製した（10倍希釈）。

【0079】（2）コントロール培地の調製

・ネガティブコントロール：KBM培地2mlに、DMSOを2 μ l添加して調製した（DMSO 0.1%）。

・ポジティブコントロール：ネガティブコントロール培地*

細胞増殖度の算出法

$$(\text{対象試料の細胞増殖度}) = \frac{(\text{対象試料のアラマーブルー還元率})}{(\text{ネガティブコントロールのアラマーブルー還元率})}$$

X100 (%)

さらに細胞増殖促進指標を、下記計算式に従って算出した。 ※【0083】

※30 【数2】

（対象試料の細胞増殖促進指標）

$$= \frac{(\text{対象試料の細胞増殖度}) - (\text{ネガティブコントロールの細胞増殖度})}{(\text{ポジティブコントロールの細胞増殖度}) - (\text{ネガティブコントロールの細胞増殖度})}$$

このときネガティブコントロールの細胞増殖促進指標は0、
ポジティブコントロールの細胞増殖促進指標は1となる。

【0084】F. 結果：測定した上記各対象物質における、上記細胞増殖促進指標を下記第1表に示す。 40 【表1】

*地に、インシュリン（5mq/ml）を2 μ l、ハイドロコチゾン（0.5mq/ml）を2 μ l添加して調製した。

【0080】D. 対象物質培地交換：上記A、Bにおいてヒト毛包上皮系培養細胞及びラット毛包上皮系培養細胞を調製した96well-plate中のKGM培地を、対象物質添加培地及びコントロール培地（200 μ l/well）と交換して、交換後37℃、5%CO₂で2日間培養した。なお、この培地の交換はウエル内のKGM培地を、底面に付着している細胞を傷つけないように留意しつつアスピレーターで抜いて、その後速やかに対象物質添加培地等をウエルの両端から添加することにより行った。

【0081】E. 細胞増殖の測定：アラマーブルー（alamar blue：アラマーバイオサイエンス社製）を培地量（容量）に対して、1/10量を添加して、37℃（5%CO₂）で6時間インキュベートした。インキュベート後、系の595nm及び570nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー（Micro plate reader: Bio RAD社製）を用いて測定し、下記計算式に従って、細胞増殖度を算出した。

【0082】

【数1】

第 1 表

	抽出液名	抽出法	毛包上皮系細胞増殖促進効果	
			ラット由来細胞	ヒト由来細胞
対象試料	コンフリー	30% エタノール抽出	1.2	0.8
	ウコン	30% エタノール抽出	1.1	0.8
	タイソウ	10% エタノール抽出	1.1	0.8
	サイシン	30% エタノール抽出	1.1	0.8
	ヨクイニン	水抽出	1.1	0.7
	ステビア	水抽出	0.9	0.7
	アセンヤク	60% エタノール抽出	0.9	0.7
	ローヤルゼリー	パウダー	0.9	0.7
	ゲンチアナ	30% エタノール抽出	0.8	0.7
	ホップ	30% エタノール抽出	0.8	0.7
	アズキ	水抽出	0.8	0.7
	ヒキオコシ	水抽出	0.8	0.7
	アルニカ	30% エタノール抽出	0.8	0.6
	ハッカ	水抽出	0.8	0.6
	カンゾウフラボノイド	水抽出	0.7	0.6
	ブクリョウ	50% エタノール抽出	0.7	0.6
	ダイズ	100% エタノール抽出	0.7	0.6
	シソ	水抽出	0.7	0.6
	キナ	10% エタノール抽出	0.7	0.6
	スギナ	水抽出	0.7	0.6
	アムズ核膜	水抽出	0.7	0.6
	カンゾウ抽出液	水抽出	0.7	0.5
	サンザシ	10% エタノール抽出	0.7	0.5
	センブリユウ	30% エタノール抽出	0.6	0.5
	ケイヒ	水抽出	0.6	0.5
	レイシ	水抽出	0.6	0.5
	チヨウジ	80% エタノール抽出	0.6	0.5
	トウヒ	60% エタノール抽出	0.5	0.5
対照試料	チャ	水抽出	0.0	0.0
	バクモンドウ	10% エタノール抽出	0.0	0.0

【0085】この結果より、上記成分に毛包上皮系培養細胞の増殖活性が確かに認められた。すなわち、上記成分には毛髪上皮系細胞の分裂増殖活性の維持による、毛髪における成長期の維持、延長作用が認められることが明らかになった。

【0086】以下、本発明毛髪成長期延長剤の処方を実施例として示し、さらにこれらの育毛効果の検討を行った。

【実施例1】 液状毛髪成長期延長剤の調製

上述したコンフリーの30%エタノール乾燥物0.1%を、70%エタノール90%、オレイン酸ナトリウム0.1%、ドデシルベンゼンスルホン酸0.49%、硬化ヒマシ油エチレンオキシド(40モル)付加物0.5%

*%及びイオン交換水(残余)と混合攪拌して溶解させた。さらにイオン交換水(10%)を添加混合して、液状の毛髪成長期延長剤を得た。この液状の毛髪成長期延長剤の処方において、上述したバクモンドウの10%エタノールを用いた抽出物の乾燥物0.1%を、上記のコンフリーの30%エタノール抽出乾燥物に代えて調製した液状の剤を対照として調製した(比較例1)。

30 【0087】【実施例2】 乳液状毛髪成長期延長剤の調製

上述したコンフリー抽出物の製造工程において、30%エタノールに代えてメタノールを用いた抽出物を得て、これを以下の処方の乳液状毛髪成長期延長剤において用いた。

配合成分

(A相)

コンフリー抽出物乾燥物	1.0
ポリオキシエチレン(60モル)付加硬化ヒマシ油	2.0
グリセリン	10.0
ジプロピレングリコール	10.0
1,3-ブチレングリコール	5.0
ポリエチレングリコール1500	5.0

(B相)

セチルイソオクタネート	10.0
スクワラン	5.0
ワセリン	2.0
プロピルパラベン	2.0

(C相)

カルボキシビニルポリマー1%水溶液	30.0
-------------------	------

配合量(重量%)

17

18

ヘキサメタリン酸ソーダ

0.03

イオン交換水

8.35

(D相)

イオン交換水

4.5

(E相)

KOH

0.12

イオン交換水

5.0

【0088】<製造法>A相、B相をそれぞれ60℃で加熱溶解し、混合してホモミキサー処理しゲルを作り、これにD相を徐々に添加しホモミキサーで分散した。次にこれに溶解したC相を加え、最後に溶解したE相を添加しホモミキサーで乳化してO/W乳液型の毛髪成長期延長剤を得た。

*【0089】〔実施例3〕 クリーム状毛髪成長期延長剤の調製

10 実施例2と同様に、コンフリーのメタノール抽出乾燥物を、以下の処方のクリーム状毛髪成長期延長剤において用いた。

*

配合成分	配合量(重量%)
(A相)	
流動パラフィン	5.0
セトステアリルアルコール	5.5
グリセリルモノステアレート	3.0
EO(20モル)-2-オクチルドデシルエーテル	8.0
プロピルパラベン	0.3
香料	0.1
(B相)	
コンフリーエキス抽出物	5.0
グリセリン	8.0
ジプロピレングリコール	20.0
ポリエチレングリコール4000	5.0
ドデシル硫酸ナトリウム	0.1
ヘキサメタリン酸ソーダ	0.005
イオン交換水	39.995

【0090】<製造法>A相、B相をそれぞれ加熱溶解し混合し、ホモミキサーで乳化してクリーム状の毛髪成長期延長剤を得た。

【0091】〔試験例2〕 本発明毛髪成長期延長剤の育毛作用の検討

本発明毛髪成長期延長剤の脱毛防止、発毛効果等の育毛作用を調べるために、以下の方法でヒトに対してトリコグラム試験を実施した。被験試料及び対照試料は、実施例1～3の本発明毛髪成長期延長剤、比較例1の剤及び70%エタノールである。

【0092】試験方法

上記試料の使用前と使用後の抜去毛髪の毛根を顕微鏡下

30 で観察し、毛根の形態から、成長の止まった毛の毛根である「休止期毛根」数を計数し、その割合の増減によってこれらの試料の育毛作用を比較した。すなわち、被験試料及び対照試料をそれぞれ男性被験者10名の頭皮に1日2回、1回2mlずつ6カ月間連続して塗布し、塗布直前及び6カ月間塗布終了直後に被験者1名につき100本ずつ毛髪を抜去し、それぞれの毛根を顕微鏡下で観察した。また、上記試料における育毛効果が有効か無効かに関する実使用テストを行った。

40 【0093】これらの試験の結果を、下記第2表に示す。

【表2】

第2表

試料 (対照及び育毛剤 番号)	休止期毛根の割合			育毛効果の 評価
	20%以上減少 (%)	±20%	20%以上増加 (%)	
対照(70%エタ ノール)	10	50	40	無効
実施例1	50	25	25	有効
実施例2	55	35	10	有効
実施例3	50	35	15	有効
比較例1	10	55	35	無効

【0094】この第2表の結果から、コンフリー抽出物を有効成分として配合した本発明毛髪成長期延長剤には、このコンフリー抽出物の毛髪成長期延長効果に基づく育毛効果が認められた。

【0095】また、上記したコンフリー抽出物以外の植物抽出物等においても、コンフリーと同様に毛髪成長期延長効果が認められたことから、これらの植物抽出物等*

※を有効成分として配合した本発明毛髪成長期延長剤においても、上記の実施例と同様に育毛効果が認められることは明らかである。

【0096】

【発明の効果】本発明により、毛髪伸長の促進することによって毛周期における成長期を維持又は延長する毛髪成長期延長剤が提供される。

【手続補正書】

【提出日】平成10年1月30日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正内容】

【0065】B. ラット毛包上皮系細胞

1. ラット毛包上皮系細胞の採取：

(1) 毛包の採取

※新生児(3~4日令)のラットの背部皮膚を採取し、この採取した背部皮膚を1%PSF含有PBS(-)に2枚ずつ浸した。その後、皮膚脂肪層から下の皮下脂肪や皮膜等を解剖用ハサミで除去した。次いで、再びこの背部皮膚を1%PSF含有PBS(-)に浸し、さらにこれを0.25%トリプシン含有PBS(-)(0.02%EDTA含む。以下、同様である。)中に4℃で一晩浸した。

※

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A61K 35/78

識別記号

F I

A61K 35/78

Q
H

(12)

特開平10-265347

A D A

35/84

N
K
A D A C
A

35/84

(72)発明者 田島 正裕
神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株
式会社資生堂第1 リサーチセンター内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.